

渦鞭毛藻の生産する超活性海洋天然物の構造決定

著者	佐竹 真幸
号	482
発行年	1993
URL	http://hdl.handle.net/10097/17014

氏 名(本籍)	佐 ^さ 成 ^{たけ} 竹 ^{まさ} 真 ^{ゆき} 幸
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 4 8 2 号
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学 位 論 文 題 目	渦鞭毛藻の生産する超活性海洋天然物の 構造決定

論 文 審 査 委 員 (主 査)	教 授 安 元 健
	教 授 若 林 俊 樹
	教 授 目 黒 熙

論文内容要旨

序論

近年、海産生物由来の生理活性物質の探索が活発化し、強力かつ特異な活性と新奇な構造を有する化合物が次々と発見されている(Fig.1)。これらの化合物は陸上植物起源の生理活性物質に比して、 10^{-2} ～ 10^{-3} 倍もの低濃度で作用を発現するものが多く、超活性海洋天然物と呼ばれるようになった。これらの化合物を培養可能な微細藻類から入手することが出来れば、定量法の開発、作用の解明、研究試薬として必要な生理活性物質の安定した供給が可能となる。そこで、多くのポリエーテル化合物に特有な抗カビ活性を指標として数種微細藻類についてスクリーニングを行なったところ、渦鞭毛藻7種中5種に抗カビ活性を検出した。一方、シガテラ原因渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus*は天然ではシガテラ毒シガトキシとマイトトキシンを同時に生産している。しかし、培養条件下ではこれまでに数々の培養条件の検討が行なわれたにも関わらず、マイトトキシンの生産のみが確認され、シガトキシンの生産は確認されずにいた。

以上のことを踏まえ、本研究では、下記の3項目の研究を行った。

1. 抗カビ活性スクリーニングで強力な抗カビ活性が検出された渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* の抗カビ成分amphidinolの単離精製を行ない、その化学構造を解明した。
2. 渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* の新規培養株のスクリーニングを行ない、シガトキシン関連化合物生産株を確認し、また、その有毒成分の化学構造を解明した。
3. 渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* (GII-1株) の生産するマイトトキシンの構造確認を行なうために、 ^{13}C - Na_2CO_3 添加培養を行ない、 ^{13}C -強化マイトトキシンの効率的な精製法を開発し、得られた ^{13}C -強化マイトトキシンの3次元NMRを測定して、その化学構造の確認と立体化学の決定を行なった。

第一章 渦鞭毛藻*Amphidinium klebsii* の生産する抗カビ成分amphidinol の構造決定

海洋天然物中にはオカダ酸、ゴニオドミン、ガンビエル酸などの強力な抗カビ活性化合物が数多く存在し、新奇生理活性物質のスクリーニング法として抗カビ性試験は有効

な手段である。渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* にも抗カビ活性が検出されたことから、本抗カビ成分の化学構造の解明を試みた。

(1) 渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* の培養

渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* は沖縄県石垣島で採取した。単藻にした *A. klebsii* を 25℃ で3週間培養した。また、 ^{13}C NMRの感度向上のために、培地中に ^{13}C - NaHCO_3 を50mg/Lの濃度になるように添加培養した。定常期の細胞密度は 1.5×10^4 cells/mLであった。

(2) Amphidinol の単離精製

藻体抽出物は溶媒分画後、黒カビ *Aspergillus niger* に対する抗カビ活性を指標として精製を行ない、40Lの培養によって3 mgのamphidinolを単離した(Fig.2)。

(3) Amphidinol の構造決定

Amphidinolは非結晶性の固体として単離され、 UV_{max} (MeOH) 226, 259, 270, 282 nm ; IR 3400, 1240, 1220 cm^{-1} ; HR-FABMS $[\text{M}-\text{Na}]^-$ m/z 1465.8120 $\text{C}_{73}\text{H}_{125}\text{O}_{27}\text{SNa}$ (calcd. $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 1465.8129)であった。その結果、分子内に共役ジエン、共役トリエン、水酸基、硫酸エステルの存在が示唆された。硫酸エステルは無機イオン分析により確認した。

Amphidinolの構造解析は主にNMRを用いて行なった。 ^1H NMRではポリオキシ化合物に特徴的な3 ppmから5 ppm付近に多数のシグナルが幅広く観測された(Fig.3)。

各種2次元NMRスペクトルの解析から、C1-C6、C18-C69 のフラグメントを得ることが出来た。二重結合の幾何異性、6員エーテル環の構造は、結合定数(16Hzおよび10Hz)とNOE実験により決定した。

C6-C18の繰り返し構造はNMRだけではシグナルの重なりが激しく決定が困難であったが、FAB MS/MSの解析により決定した(Fig.4,5)。

(4) Amphidinol の生物活性

Amphidinolはペーパーディスク法においては6 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の濃度で黒カビ *A. niger* に対して阻止円を形成した。この値は抗真菌剤 amphotericin Bの3倍の活性を有していた。一方、*Escherichia coli* などのバクテリアには10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ でも阻止円を形成しなかった。また、0.5%マウス血球浮遊液を84ng/mlで完全溶血し、標準サポニンの約120倍の値を示した。

ヒメダカに対する魚毒性は1ppmの濃度で致死毒性を示した。マウス致死毒性は200 µg/kgで活性を示さなかった。

第二章 渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* ランギロア株 (RGI-1)の生産する生理活性物質の構造決定

(1) 渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* のスクリーニング

渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* はシガテラ毒ciguatoxin (CTX)とmaitotoxin (MTX)を生産するとされていた。しかし、これまでに培養ではMTX生産のみが確認され、CTX関連化合物生産の確認はなされていなかった。その原因を株による生産物の違いと考え、これまで継代培養してきたフランス領ポリネシアガンビエル諸島株(GII-1)に加えて、新たにフランス領ポリネシアのランギロア環礁(RGI-1)、沖縄県阿嘉島(AKI-1)、サイパン島(SIO-1)株を培養した。スクリーニングには、マウス致死毒性と抗カビ活性を用いた。その結果、ランギロア株は他の3株と異なり、藻体脂溶性画分にも毒性が検出された。そのマウス致死症状はMTXの症状とは異なり、下痢、呼吸困難、後肢麻痺、痙攣と多岐に渡り、CTXの示す症状と一致した。また、ガンビエル株には培養ろ液に強い抗カビ活性が検出されたが、ランギロア株では検出されなかった。

(2) *Gambierdiscus toxicus* ランギロア株の生産する有毒成分の精製

ランギロア株脂溶性画分の有毒成分がCTX関連化合物であることの化学的根拠を得るために、有毒成分の精製を行った。

脂溶性画分を各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行ない、1100Lの培養からgambierol、CTX3C、CTX4Aの3成分をそれぞれ1.2mg、700µg、400µg単離した(Fig.6)。

(3) 有毒成分の構造決定

[1] Gambierol

Gambierolは非結晶性の無色固体として得られ、HR-FAB MS $[M+Na]^+$ m/z 779.4348 $C_{43}H_{64}O_{11}$ (calcd. $[M+Na]^+$ 779.4346)、UVmax 237 nmであった。

1H NMRからgambierolの基本骨格はCTX関連化合物とは異なり、分子内に、5つのシン

グレットメチル、3つの水酸基、共役ジエンを含む4つの二重結合を持つポリエーテル化合物と推定された(Fig.7)。2次元NMRの解析によりシングレットメチルの結合した4級炭素で分断された5つのフラグメントを得ることが出来た。HMBCスペクトルを測定した結果、シングレットメチルからの $2,3J_{CH}$ のクロスピークが明瞭に観測され、全炭素骨格を帰属することが出来た。

エーテル環の構造はNOE実験と角間共有プロトンの結合定数(9Hz)により環がトランスに縮合し、はしご状に連結したポリエーテル構造であることが証明された。また、6位水酸基と43位メチル基の立体はNOE実験でH6/Me39とH27/Me43のNOEが観測されたことから β 配位であると決定した。二重結合は、結合定数(11Hz)より全てZ配置と決定した。以上の解析からgambierolの構造を決定した。gambierolはポリエーテル構造ということでCTXと共通していたが、基本骨格は全く異なる新奇化合物であった(Fig.10a)。

[2] CTX3C

CTX3CはHR-FAB MSにより $[M+H]^+ m/z$ 1023.5660が観測され、分子式は $C_{57}H_{82}O_{16}$ (calcd. $[M+H]^+ 1023.5680$)と推定された。210 nm以上にUV吸収強大を示さなかった。

CTX3Cの 1H NMRは先に*G. toxicus* 天然藻体から単離構造決定されたCTX4Bと非常に類似していた(Fig.8)。CTX3CではCTX4Bの分子末端共役ジエンに相当するシグナルが消失し、新たに4.05と4.35ppmにオキシメチレンに相当するシグナルが観測された。このことから、CTX3CはCTXと異なり分子末端側鎖が欠落した構造と推定した。また、2.31と2.86ppmにアリルメチレンのシグナルが観測され、これが17位のプロトンであったことからCTX3CはE環の7員環が8員環に変換していると推定した。21位以降の構造は各種NMRデータがCTX4Bと完全に一致したことから、F環からM環までの構造は立体を含めて同一であると推定した(Fig. 10b)。

[3] CTX4A

CTX4AはHR FAB MS m/z $[M+Na]^+ 1083.5640$ $C_{60}H_{84}O_{16}$ (calcd. $[M+Na]^+ 1083.5660$)を与え、分子式がCTX4Bの値と一致した。

両者の 1H NMRを比較するとメチル基周辺のシグナルに変化が見られた(Fig.8)。2次元NMRの解析からプロトンのつながりと結合定数が一致した。しかしながら、L環、M環周辺のプロトンのケミカルシフトに差が認められた。この差は52位スピロ炭素の立体の

反転により生じたと推定し、NOE実験を行なった(Fig.9)。53位メチレンの α プロトンを照射した時、48位角間メチンに顕著なNOEが観測された。この結果、CTX4Aは53位メチレンがL環にアキシアルに配向した構造をとった52(S)CTX4Bであると推定した(Fig.10 c)。

(4) 有毒成分の生物活性

各有毒成分の腹腔内投与によるマウス致死毒性は、gambierolが50 $\mu\text{g/kg}$ 、CTX3Cが1.2 $\mu\text{g/kg}$ 、CTX4Aが2 $\mu\text{g/kg}$ であった。その症状は下痢、呼吸困難、後肢麻痺、痙攣と共通していた。

第三章 渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* ガンビエル株(GII-1)の生産するmaitotoxinの3次元NMRの解析

Maitotoxin(MTX, Fig. 11)の構造の確定および立体化学の決定を行なうために、3次元NMRを適用し、この問題の解決を試みた。

(1) ^{13}C - Na_2CO_3 添加培養

G. toxicus ガンビエル株の生産するMTXの3次元NMRを測定するためには、 ^{13}C 側の感度を上げることが必須である。そこで、 ^{13}C - Na_2CO_3 添加培養を行なった。培地に*G. toxicus*を接種して10日後に ^{13}C - Na_2CO_3 を50mg/Lの濃度で添加した。添加培養と未添加培養で定常期における細胞密度に差はなかった。最終的に2800 Lの ^{13}C - Na_2CO_3 添加培養を行なった。

(2) Maitotoxinの精製法の改良

Maitotoxinの効率的精製法を開発し、 ^{13}C -enrich MTXを9mg 得た(Fig.12)。

(3) Maitotoxinの3次元NMR

MTXの3次元NMRはPFG-NOESY HMQC法により測定を行った。

2D NOESYと3D PFG-NOESY HMQCを比較したした場合、2D スペクトルでは、多く

のシグナルが重複しているために解析が非常に困難であるが、3DスペクトルではNMRを ^{13}C 軸に展開することにより結合している炭素のケミカルシフト周辺のプレーンにのみシグナルが観測されるので重複は解消され、NOEの解析が簡略化した(Fig. 13)。3D NOESY HMQCにより相関の観測された部分をFig. 14に示す。以上の結果から、MTXの構造と立体化学を推定した。

総括

1. 渦鞭毛藻*Amphidinium klebsii*の生産する抗カビ成分amphidinolを単離し、その構造が炭素数69の主鎖にメチル基3、水酸基21、二重結合9、硫酸基を有するポリエンポリヒドロキシ化合物であることを明らかにした。
2. 採取地の異なる*Gambierdiscus toxicus*のスクリーニングを行ない、ランギロア株のみが異なる性質を示すことを明らかにした。ランギロア株から3種の有毒成分gambierol、CTX3C、CTX4Aを単離し、それぞれの化学構造を解明した。この結果、培養藻体によるCTX関連化合物生産を初めて確認し、シガテラ原因生物が*G. toxicus*であることを最終的に確定した。
3. *Gambierdiscus toxicus* ガンビエル株の生産するmaitotoxinの ^{13}C 濃度を高めて、3D PFG-NOESY HMQCを測定した。3D PFG-NOESY HMQCの解析からmaitotoxinの相対立体を推定した。非蛋白性の天然物の構造解析としては初めて3次元NMRを適用し、成果を収めた。

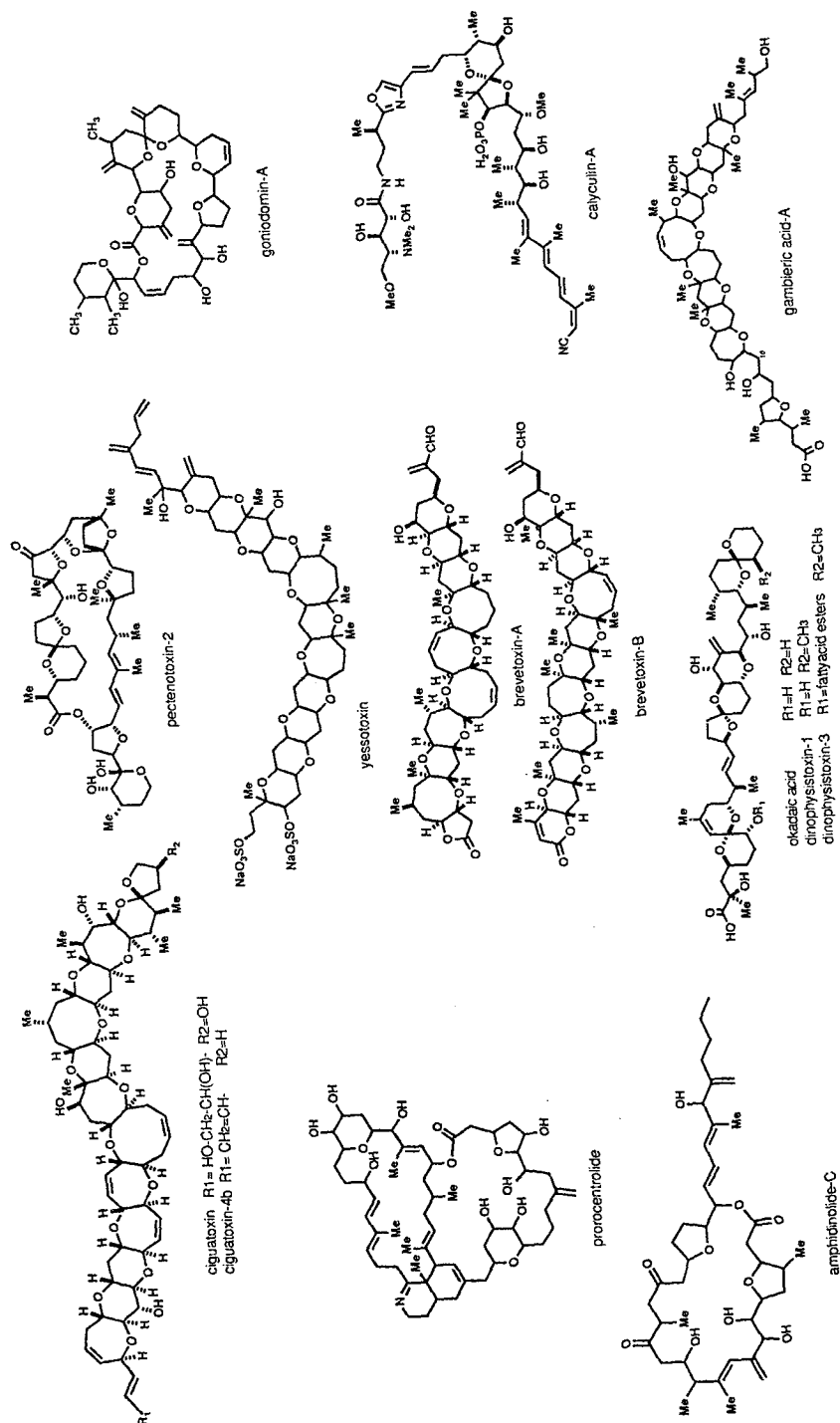


Fig. 1 Super-active marine natural products

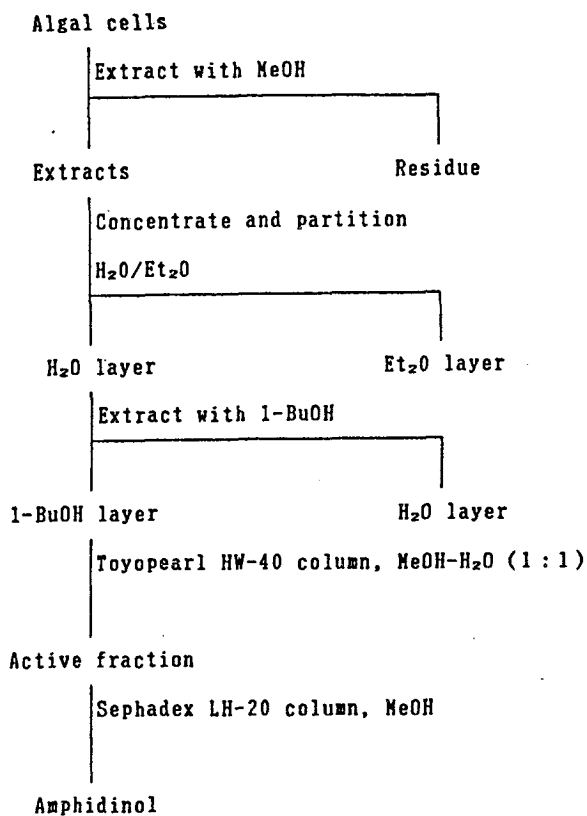


Fig. 2 Purification of amphidinol

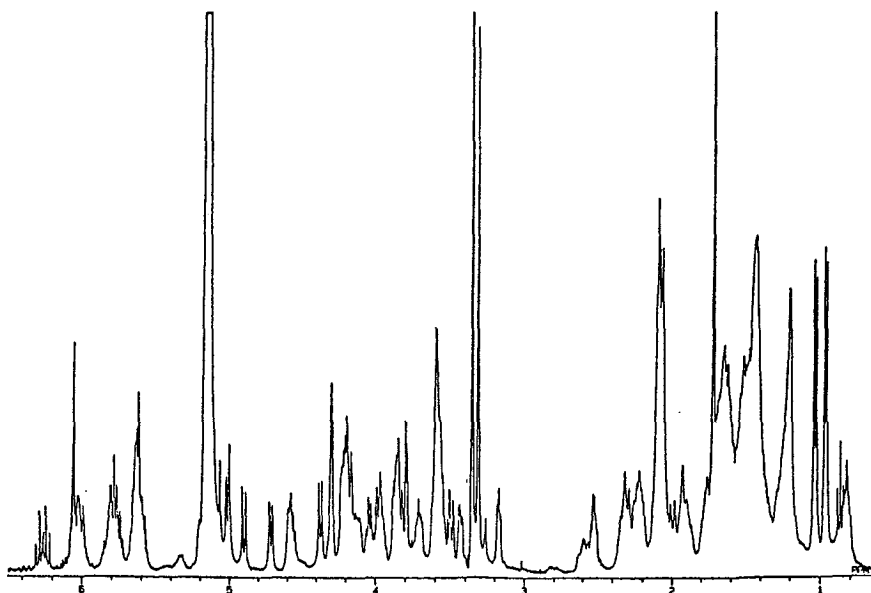


Fig. 3 ¹H NMR of amphidinol (C₅D₅N:CD₃OD 1:2, 400MHz)

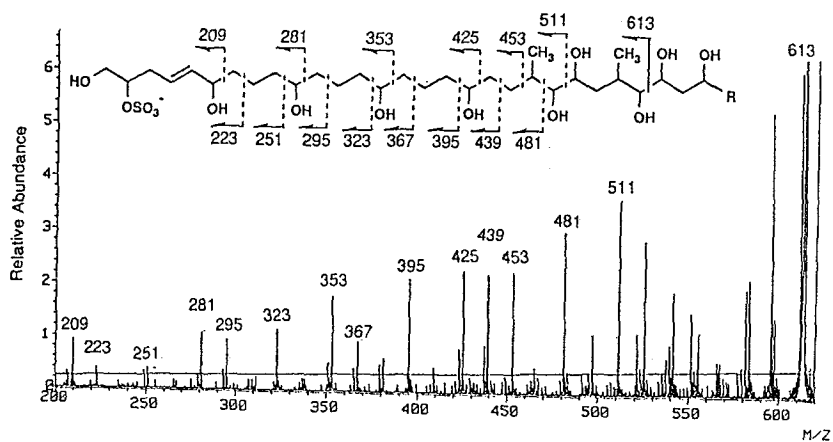


Fig. 4 Negative FAB MS/MS of amphidinol (m/z 613)

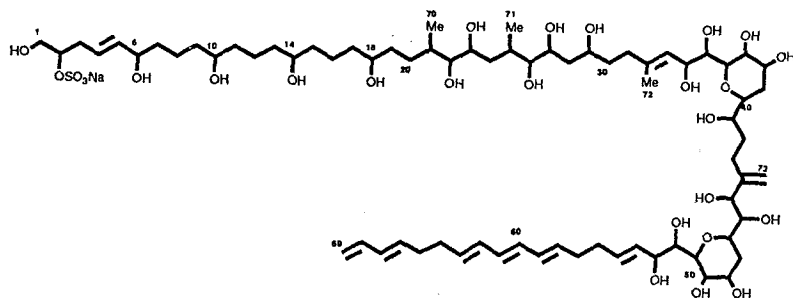


Fig. 5 Structure of amphidinol

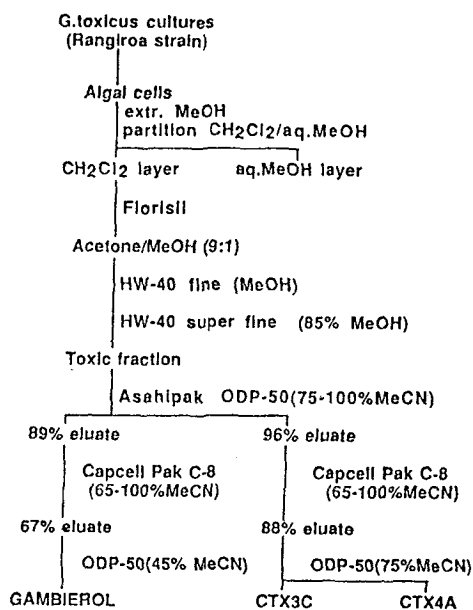


Fig. 6 Purification of ciguatoxin related compounds from Rangiroa strain

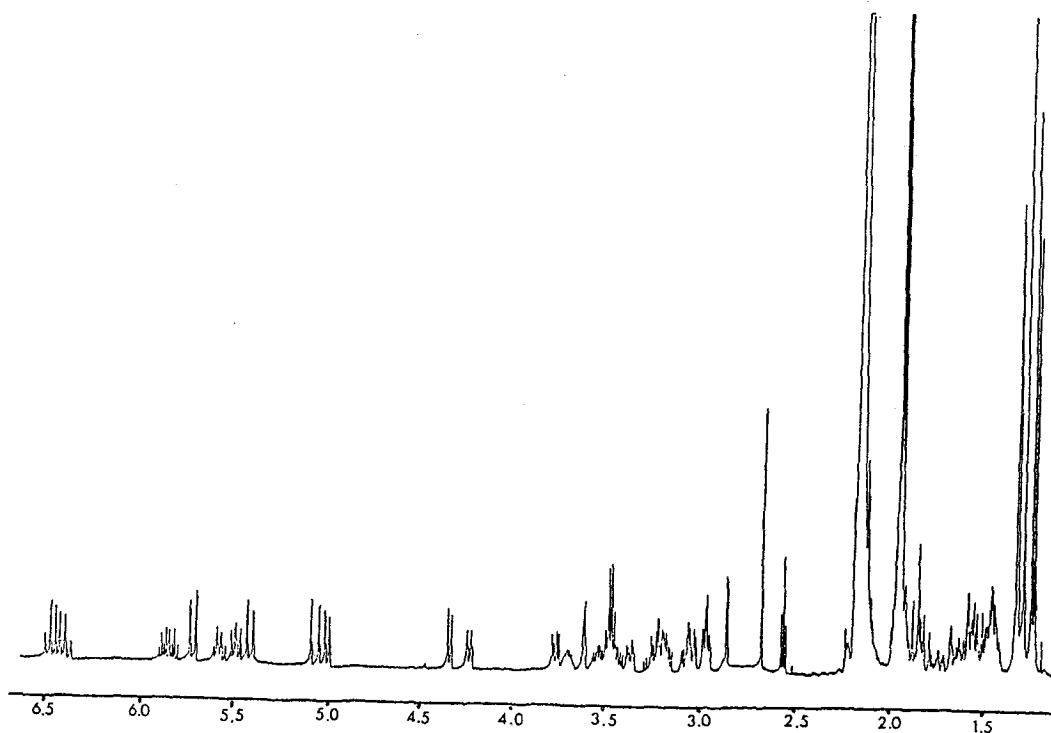


Fig. 7 ¹H NMR of gambierol (CD₃CN, 400MHz)

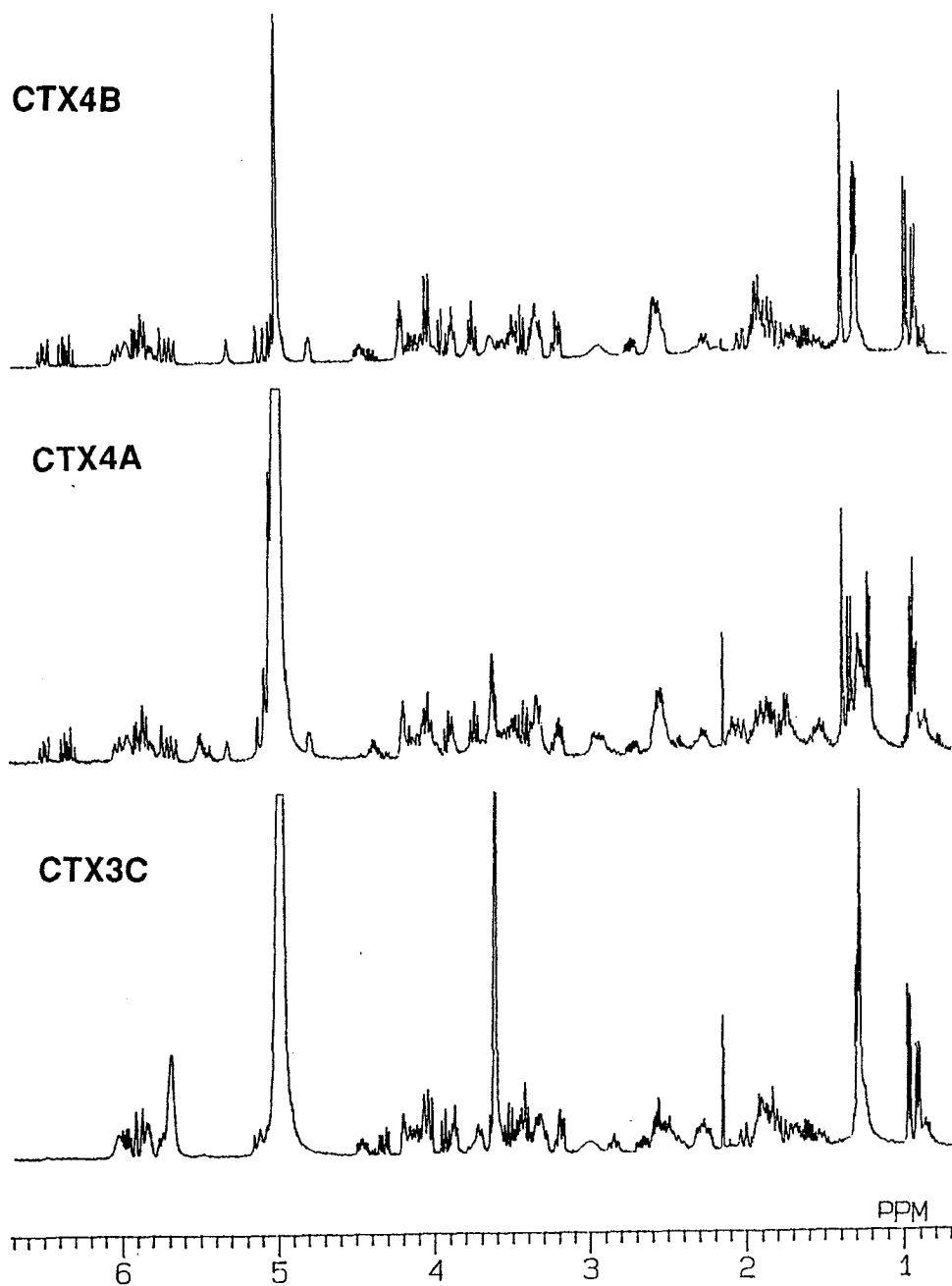


Fig. 8 ^1H NMR of CTX3C, CTX4A and CTX4B ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400MHz)

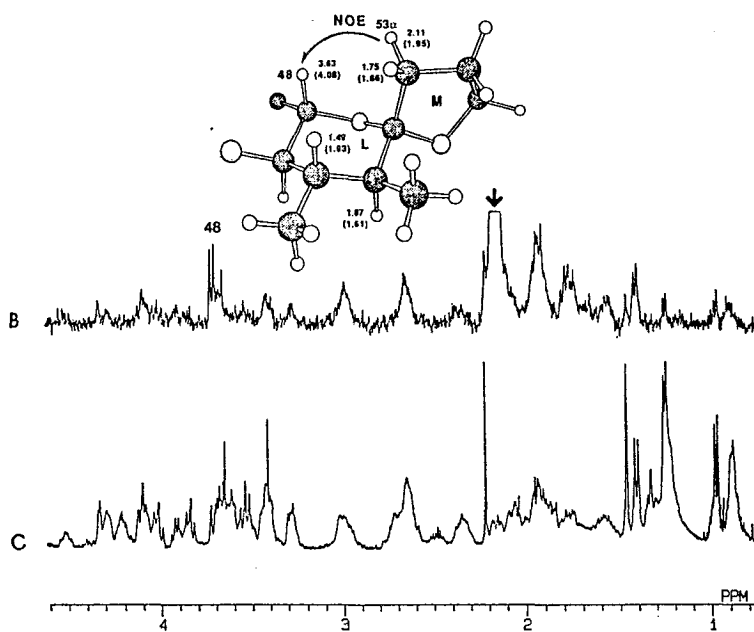


Fig. 9 NOE experiment of CTX4A (C_5D_5N , 400MHz, $-15^\circ C$)

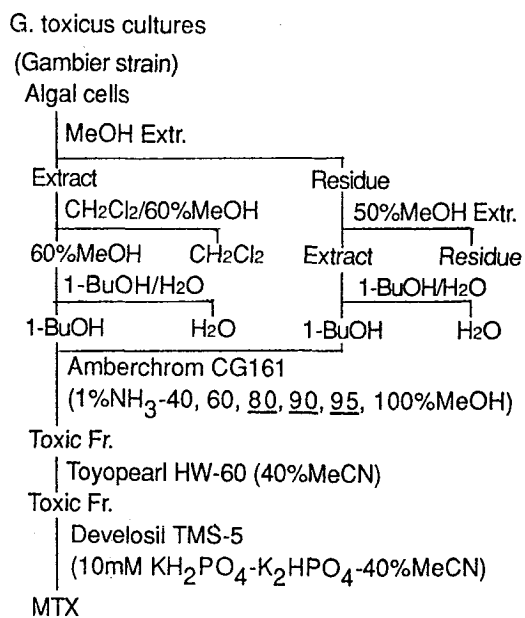


Fig. 12 Purification of maitotoxin from Gambier strain

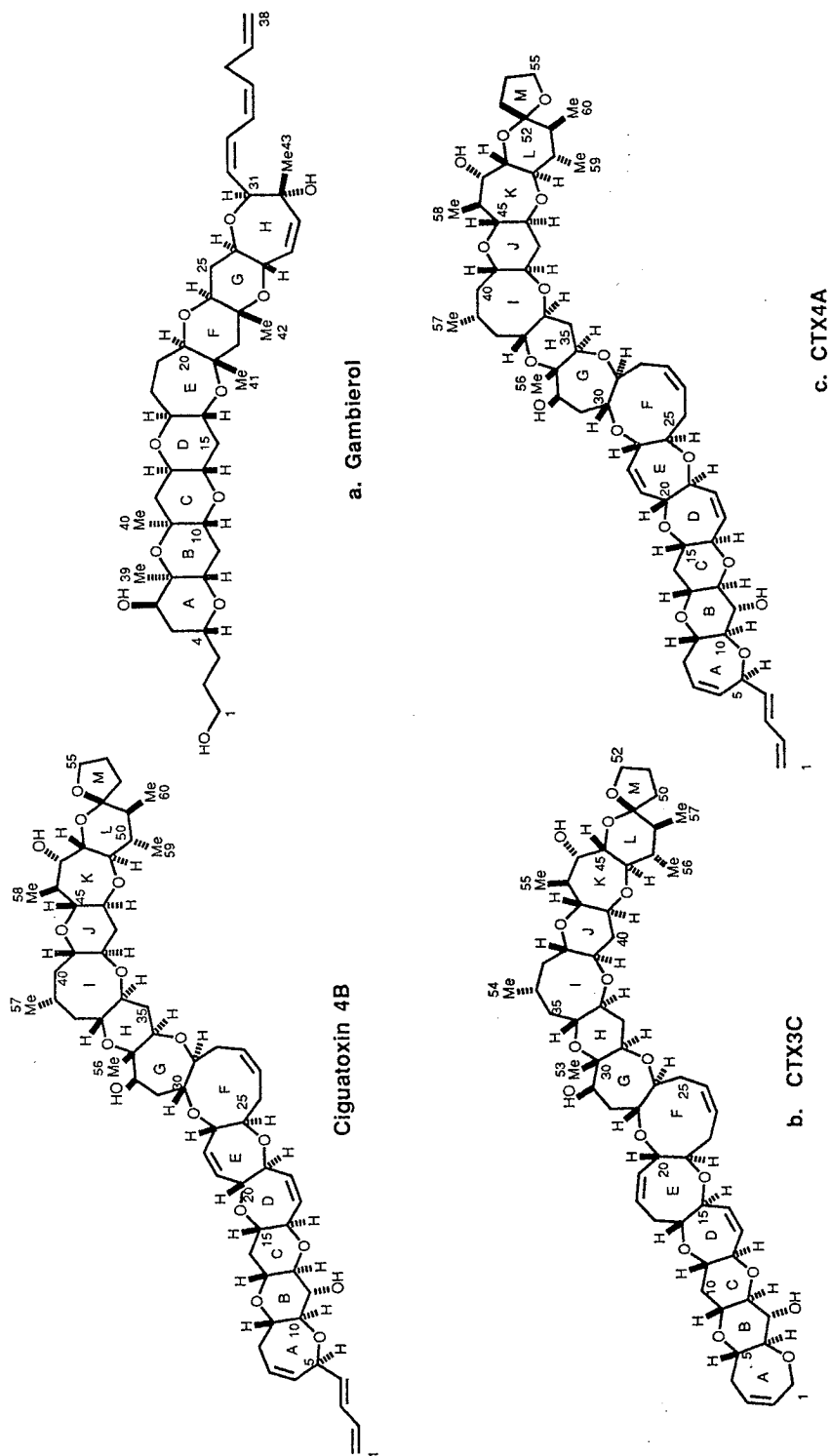


Fig. 10 Structures of CTX4B and Ciguatera Toxins from Rangiroa Strain

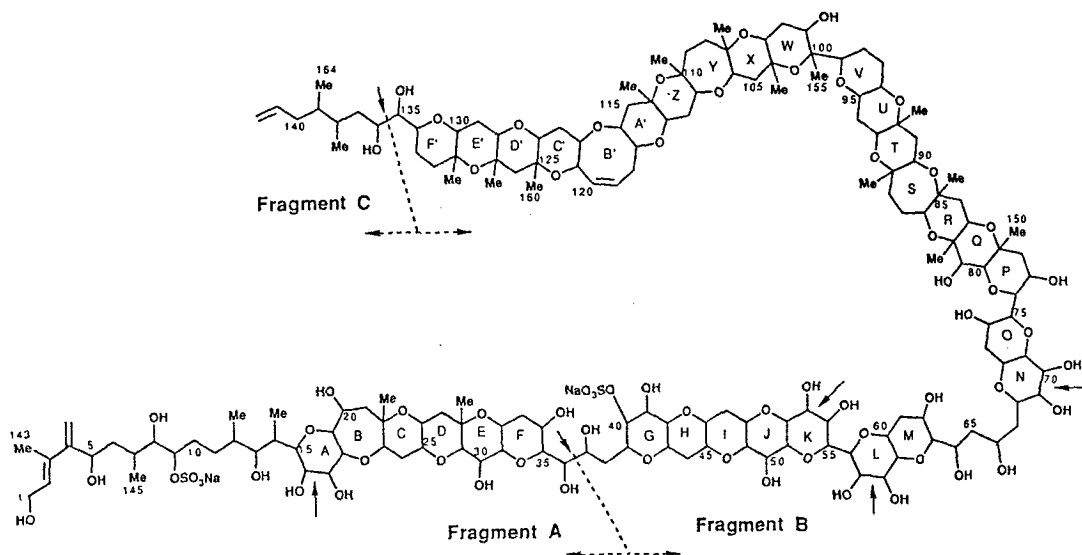


Fig. 11 Structure of maitotoxin

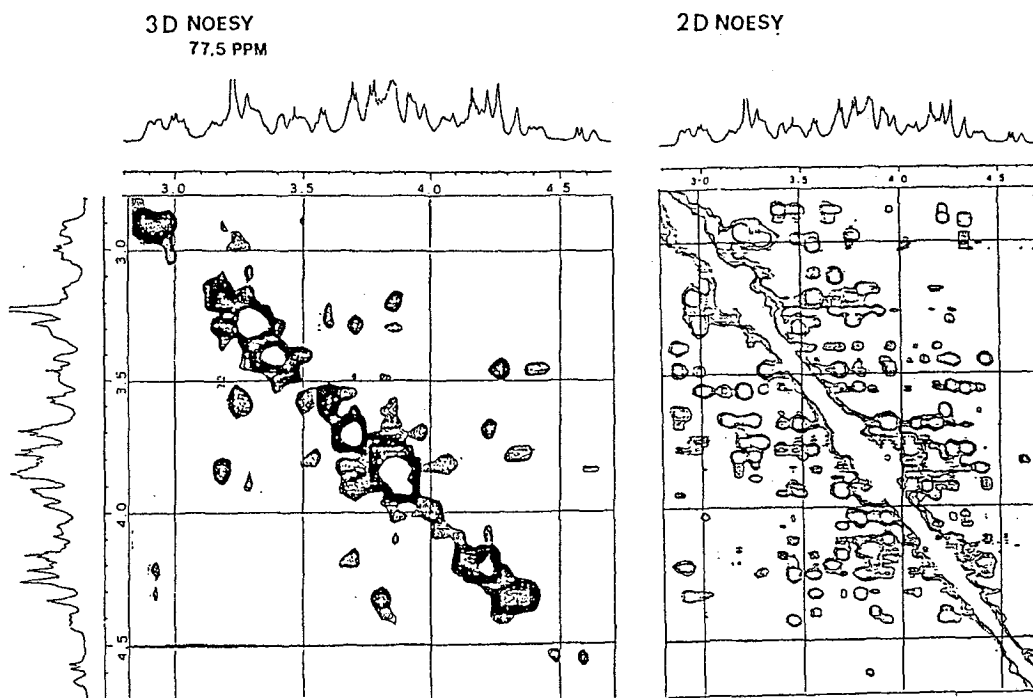
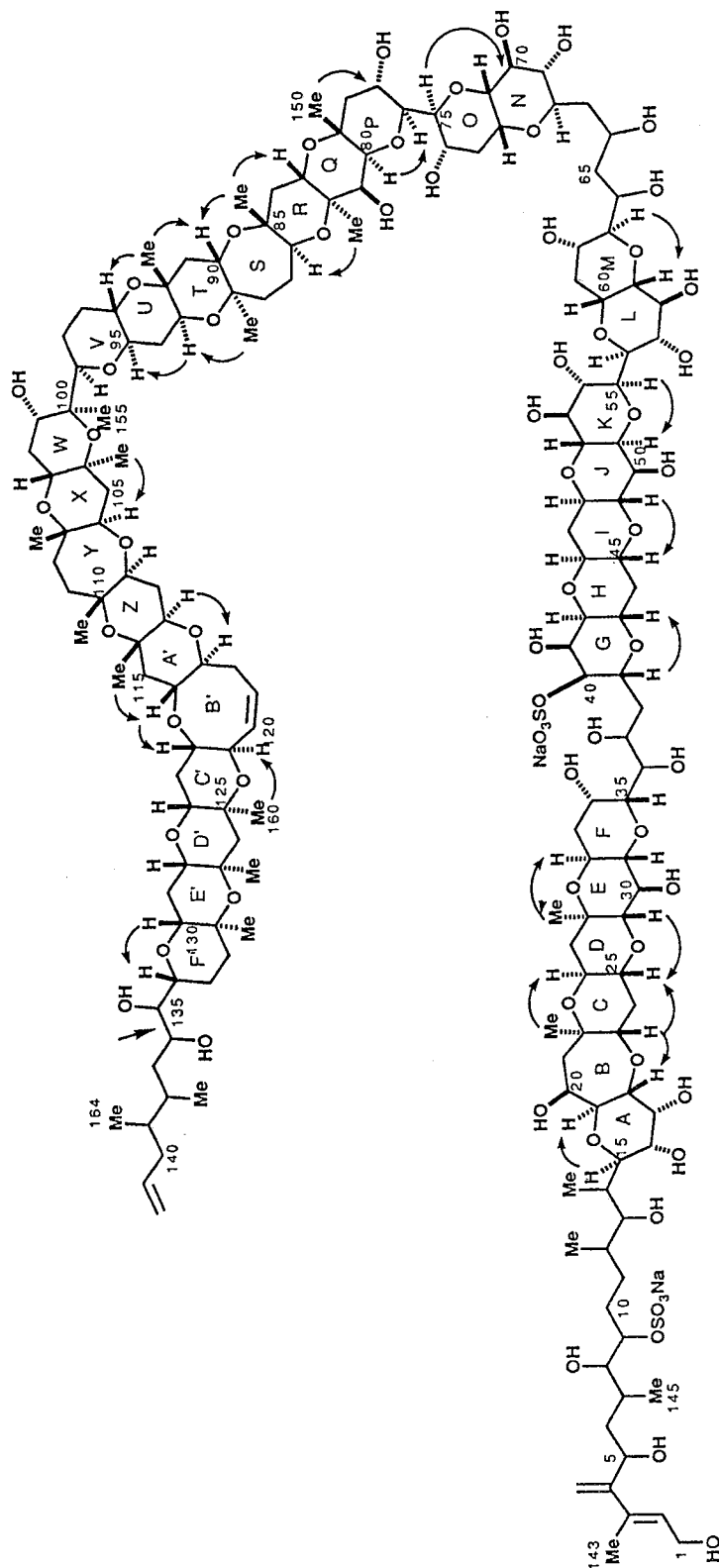


Fig. 13 3D PFG-NOESY HMQC and 2D NOESY



Arrows denote NOE correlations observed on 3D PFG NOESY HMQC

Fig. 14 Probable Stereostructure of Maitotoxin

論文審査の要旨

渦鞭毛藻類は赤潮を形成して魚類の大量斃死を招き、あるいは、魚貝類の毒化の原因となる。食品衛生あるいは産業上の対策を講じる上で原因物質の化学的解明は必須であるが、活性物質の本体は高度に酸素化された新規骨格を有し、分子量が大きく、かつ微量にしか得られないので、その構造決定には極めて困難が多い。本研究はシガテラと呼ばれる魚類の毒化現象に関連した海産渦鞭毛藻を中心に、その生理活性物質の化学構造の決定を目的として行われた。

まず、海産ポリエーテル化合物に比較的特徴的な抗カビ活性を指標として渦鞭毛藻のスクリーニングを実施し、Amphidinium klebsii に強い活性を検出し、その活性本体を amphidinol と命名して単離・構造決定を行った。その結果、amphidinol はクロカビに対する生育阻害活性が抗真菌剤 amphotericin B の 3 倍、溶血活性が植物サポニンの 120 倍を示す強力な活性物質であることが判明した。本成分の分子量は 1488 もあり、分子式 $C_{73}H_{125}O_{27}SNa$ を有する複雑な構造を有していたが、僅か 2 mg の試料を用いて平面構造を決定した。

次にシガテラの毒化原因と推定されていた渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus のクローン株を作成して活性物質を検索し、RGI-1 株から ciguatoxin の類縁体である CTX3C 及び CTX4A、さらに、新規化合物 gambierol を単離・構造決定し、本生物がシガテラの真の原因生物であることを証明した。

最後に、G. toxicus の生産する maitotoxin の構造確認に 3 次元 NMR の手法を天然物としては初めて適用し、分子量が 3422 もある巨大ポリエーテル化合物の NMR シグナルの帰属および相対立体配置の推定を行った。

ここに構造決定された化合物の分子量はいずれも 1000 を越えており、特に maitotoxin は蛋白や多糖類を除けば最大の天然有機化合物である。構造決定に際しては培養によって ^{13}C 核の濃度を高め、NMR 解析を容易にする手段が導入された。シグナルの重複による困難の解決には、最新の 2 次元 NMR の手法のみならず、3 次元 NMR の適用を初めて実現した。また、NMR と平行して質量分析の最新手法である FAB-MS/MS を用いて成功を収めた。このように著者は天然物化学として高度の成果を収め、更に海産毒の起源と動態を化学的に証明した。よって本研究の成果は博士（農学）の授与にふさわしいと判断された。